

TARTU ÜLIKOOL
Sporditeaduste ja füsioteraapia instituut

Anu Ellam

**Glükokortikoidsete hormoonide kõrgete dooside mõju lihas-, rasv- ja
luukoele ning regeneratsioonipotentsiaali avaldumisele**

**The effect of high-doses of glucocorticoids on muscle, adipose and bone
tissues and their regenerative potential**

Magistritöö

Kehalise kasvatuse ja spordi õppekava

Juhendajad:
PhD, P.Kaasik

PhD, K. Alev

Autori allkiri

Tartu 2016

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
LÜHIÜLEVAADE.....	4
ABSTRACT	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Glükokortikoidsete hormoonide kataboolne toime.....	6
1.2 Glükokortikoidid müopaatia initsieerijatena	6
1.3 Glükokortikoidide mõju rasvkoele	8
1.4 Glükokortikoidide mõju luukoele	8
2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED	10
3. METOODIKA	11
3.1 Katseloomad	11
3.2 Glükokortikoidne müopaatia	11
3.3 Kehakaalu ja lihaskaalu määramine.....	11
3.4 Keha koostise ja luutiheduse määramine	12
3.5 Statistiline töötlus	12
4. TÖÖ TULEMUSED.....	13
5. TULEMUSTE ARUTELU.....	18
6. JÄRELDUSED	21
KASUTATUD KIRJANDUS	22
AUTORI LIHTLITSENTS	26

KASUTATUD LÜHENDID

DXA – kahekordse kiirega röntgenabsorptsiomeetria (*dual-energy X-ray absorptiometry*)

EXT – *musculus extensor digitorum longus* (*m. extensor digitorum longus*)

Gastro – *musculus gastrocnemius* (*m. gastrocnemius*)

GC – glükokortikoidid

HMC – müosiini rasked ahelad

IgF-I – insuliinitaoline kasvufaktor I

PLA – *musculus plantaris* (*m. plantaris*)

SOL – *musculus soleus* (*m. soleus*)

TA – *musculus tibialis anterior* (*m. tibialis anterior*)

LÜHIÜLEVAADE

Glükokortikoididel on mitmeid erinevaid vastusreaktsioone, eelkõige avaldub glükokortikoidsete hormoonide efekt läbi põletikuvastase ja immuno-supressiivse toime terapeutiliste dooside manustamisel. Kahjuks avaldub glükokortikoidide pikaajalisel kasutamisel terve rida soovimatuid kõrvalmõjusid – lihasmassi kadu, rasva ainevahetuse häirumine ja võimalik destruktiivne mõju luukoe ainevahetusele.

Eesmärk: Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli selgitada glükokortikoidsete hormoonpreparaatide manustamise mõju katseloomade lihas-, rasv- ja luukoe kaalulistele ja integraalsetele näitajatele ja selgitada regeneratiivsete protsesside dünaamika kulgemist lihas-, rasv- ja luukoe tasandil.

Metoodika: Eksperimendis kasutati täiskasvanuid *Wistari* liini rotte. Katseloomadele manustati 10 päeva jooksul intraperitoneaalselt deksametasooni degeneratiivsete protsesside indutseerimiseks. 10 ja 20 päeva pärast viimast deksametasooni manustamist uuriti regeneratiivsete protsesside avaldumist katseloomade lihas-, rasv- ja luukoele.

Tulemused: Meie tulemused näitasid, et kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi 10-päevase manustamise tulemusena langeb katseloomade kehakaal ja keha rasvamass. Samal ajal langes põhiliselt kõrge kiirete lihaskiudude osakaaluga skeletilihaste kaal võrreldes kõrge aeglaste lihaskiudude osakaaluga skeletilihaste kaaluga. Peale 20-päevast taastumisperioodi näitasid meie andmed katseloomade keha kaalu ja lihaste kaalu tõusu. Vastavalt meie andmetele jäi rasvamass ka taastumisperioodil oluliselt madalamaks võrreldes kontrollnäitajatega.

Kokkuvõte: Meie tulemused näitasid, et kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi degeneratiivne mõju lihas- ja rasvkoele ei piirdu 10-päevase manustamisperioodiga, vaid mõju väljendub preparaadi manustamise lõpetamisel veel vähemalt 10 päeva.

Märksõnad: glükokortikoidid; müopaatia; luumass; rasvamass; rasvavaba mass

ABSTRACT

Glucocorticoids have a multitude of effects on the immune response at several sites and are both anti-inflammatory and immunosuppressive when administered therapeutically. Unfortunately, muscle weakness, dysbalance in lipid metabolism and bone loss are frequent side effects of long-term glucocorticoid administration.

Aim: The aim of our study was to clarify the effects of high doses of glucocorticoids to the selected physiological characteristics of muscle-, adipose- and bone tissue. An additional aim of the study was to investigate the dynamics of regenerative processes in muscle-, adipose- and bone tissues level.

Methods: Wistar rats were used in experiments. Animals received daily intraperitoneal injections of dexamethasone to induce degenerative response (duration of administration 10 days). 10 and 20 days after the last dexamethasone administration regenerative responses in muscle-, adipose- and bone tissues were examined.

Results: Our results indicated that 10-days administration period of high doses of glucocorticoids reduced body mass and body fat mass. At the same time the loss of muscle mass appeared mostly in muscles that predominantly consist of fast-twitch fibers compared with muscles that primarily consist of slow-twitch muscle fibers. Bone mineral content and mineral density were not affected during 10 days dexamethasone administration. After 20-days of recovery period showed our data an increase in animal's body mass and in muscle weights. According to our data fat mass remained remarkably reduced compared with control values.

Conclusion: Our results showed that degenerative effect of high doses of glucocorticoids to muscle and adipose tissue is well pronounced during 10 days of administration and is extended for at least 10 days after the last injection of glucocorticoids.

Keywords: glucocorticoids; myopathy; bone mass, fat mass, fat-free mass

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Glükokortikoidsete hormoonide kataboolne toime

Glükokortikoididel (GC), mida kasutatakse hästi tuntud põletikuvastaste ja immuno-supressiivsete ravimitena, on pikaajalisel manustamisel ja kõrgete dooside korral ravitoime kõrval terve rida negatiivseid kõrvalmõjusid. Kirjanduse andmetel on suuremat tähelepanu pööratud GC rollile skeletilihaskoe müopaatia indutseerimisel (Seene, 1994; Seene et al., 1999). Samal ajal on GC destrukttiivne mõju süsteemse iseloomuga puudutades skeletilihaskoe kõrval ka rasv- ja luukude (Rebuffe-Scrive et al., 1988; Weinstein et al., 1998). Kõrgete GC dooside korral langeb olulisel määral lihasmass, areneb välja selektiivne II tüüpi lihaskiudude atroofia ja väheneb lihaskoe funktsionaalsus (Seene & Kaasik, 2016). Nii skeletilihaskoe kui luukoe puhul võib GC roll lisaks otsesele kataboolsele mõjule avalduda koe kasvu reguleerivate kasvufaktorite ja regulatsioonifaktorite retseptorite inhibeerimise kaudu (Askari et al., 1976; Silvestrini et al., 1999). GC kataboolne efekt väljendub erinevate koeliikide puhul erineva ulatuse ja erineva dünaamikaga, samuti sõltuvad taastumisprotsesside eripärad vastava koe ülesehituse ja koe uuenemisvõime spetsiifikast. GC kõrgete dooside mõjul langeb testosterooni ja insuliini kontsentratsioon, mis viitab anaboolsete protsesside supressioonile organismis (Smals et al., 1977; Tomas, 1982). Tuginedes kirjanduses avaldatud andmetele võib väita, et hoolimata anaboolsete protsesside inhibeerimisest GC poolt, avaldub GC destrukttiivne roll suuremal määral läbi katabolismi võimendavate mehhanismide (Seene, 1994). Skeletilihaskoe puhul väljendub GC kataboolne mõju nii kontraktiilse aparadi struktuuride (Seene et al., 1988), närvi-lihas ühenduste (Seene et al., 1999) ja skeletilihaskiudude elastsete filamentide (Aru et al., 2013) destruktiooni. GC kõrgete dooside poolt esilekutsutud destrukttiivste protsesside mitmekesine avaldumine skeletilihaskoe puhul on tingitud koe ülesehituse eripäradest – eritüübiliste lihaskiudude esindatusest erinevates lihastes. Kirjanduse andmed näitavad, et GC pikaajaline manustamine ja kõrged doosid võivad põhjustada morfoloogilisi muutusi rasvkoe struktuuris – kutsudes esile patoloogilise hüpertrofeerumisprotsessi adipotsüütides (Rebuffe-Scrive et al., 1988; Rebuffe-Scrive et al., 1992).

1.2 Glükokortikoidid müopaatia initsieerijatena

Lihaskiudlust mõjutab lihasvalkude pidev uuenemine. Lihasmassi staatus sõltub suurel määral ülesehitus- ja lagunemisprotsesside tasakaalust. Müofibrillogeneesi ja valkude

ainevahetuse vahelisest tasakaalust sõltub, kas rakendub lihaskoe kasvu- või kõhetumisprotsess (Sandri, 2008). GC intensiivne destruktiivne mõju skeletilihaskoele avaldub nii lihase kui organi ning lihaskiudude peenstruktuuri tasemel. Varasemad tulemused näitavad, et GC manustamise tingimustes on skeletilihaste müofibrillid oluliselt peenenenud ning müofibrillide maht lihaskiududes on vähenenud ca 1/5 ulatuses (Kaasik et al., 2007). Kontraktilsete valkude intensiivne degradatsioon ja müofibrillide struktuuri destruktatsioon on peamised faktorid, mis põhjustavad lihasmassi kadu ja lihasjõu langust GC poolt indutseeritud müopaatia tingimustes. Kirjanduse andmed näitavad, et müofibrillide destruktatsioon saab alguse perifeersest regioonist ja hõlmab GC mõju edasisel kestvusel kogu müofibrillaarse aparraadi (Seene et al., 1988). Varasemad uuringud näitavad samas, et GC mõju ei avaldu kogu müofibrillaarsele aparraadile ühesuguselt, vaid mõjutatud on eelkõige müosiini filamendid ning aktiini tundlikkus GC toimele on müosiiniga võrreldes madal (Seene & Alev, 1985). GC kõrgete dooside manustamine põhjustab degeneratiivseid muutusi peaaesjalikult IIB tüüpi lihaskiududes ja lihasvalkude kiirete isovormide ainevahetuses. Skeletilihaskoe funktsionaalsuse aspektist lähtudes toimub müosiini raskete ahelate (HMC) isovormide kompositsiooniliste muutuste kaudu lihaskiudude kvalitatiivne remodelleerumine suunaga kiiremalt kompositsioonilt aeglasemale kompositsioonile (Seene et al., 2003). Kirjanduse andmed näitavad, et lihasvalkude isovormilise kompositsiooni remodelleerumise kaudu võib olla mõjutatud ka lihaskiudude oksüdatiivne potentsiaal (Holloszy et al., 1991). Lihasmassi juurdekasv või selle kahanemine ning seeläbi funktsionaalne kvaliteet on tihedalt seotud koe regeneratsioonivõimega. Skeletilihase funktsionaalsuse ja taastumisvõime eripärad erineva geneesiga müopaatiate puhul on suurel määral sõltuvuses skeletilihase müogeensete satelliitrakkude hulgast ja nende aktivatsioonivõimest vastavates lihastes. Kirjanduse andmed näitavad, et GC manustamine mõjutab satelliitrakkude ultrastruktuuri (Seene et al., 1988). Muutused skeletilihase satelliitrakkude ultrastruktuuris ning nende arvukuse vähenemine on peamised põhjused skeletilihaskoe regeneratsioonivõime languses, mis omakorda on põhjuseks ulatuslikule lihasmassi langusele ja taastumiskiirusele GC mõju peatumisel. Valgusünteesi- ja degradatsiooni intensiivsust ning samuti skeletilihase satelliitrakkude aktivatsiooni reguleerib suurel määral insuliini-laadne kasvufaktor I (IgF-I). Kirjanduse andmed näitavad, et madala oksüdatiivse potentsiaaliga lihaskiudude (IIB tüüp) atroofia avaldub läbi IgF-I inhibeerimise (Singleton et al., 2000). IgF-I signaalraja häirumine võib omakorda mõjutada arenevate müoblastide apoptootilist aktiivsust, piirates seeläbi regeneratiivse potentsiaali avaldumist.

1.3 Glükokortikoidide mõju rasvkoele

Rasvkude mängib olulist rolli organismi aine- ja energiavahetuse substraadi ja ka regulatiivse faktorina. Samal ajal on GC rasvkoe massi ja staatuse regulatsioonis üheks võtmerolli kandjateks, reguleerides läbi erinevate signaalradade rasvamassi hulka ja rasvhapete akumulereerumist erinevates normaalfüsioloogilistes ja patofüsioloogilistes tingimustes nii inimestel (Rebuffe-Scrive et al., 1988) kui katseloomadel (Masuzaki et al., 2001). Samas näitavad kirjanduse andmed, et *in vitro* tingimustes võib GC olla märkimisväärne lipolüütiline aktiivsus (Xu et al., 2009). Rasvamassi tasakaal on imetajate organismis reguleeritud kahel erineval teel – läbi eksisteerivate adipotsüütide hüpertrofeerumismehhanismi ning hüperplaasia, mille aluseks on preadipotsüütide differentseerumise võimendumine (Bujalska et al., 1999). Seni avaldatud andmed näitavad, et preadipotsüütide differentseerumisaktiivsuse tõus GC mõjul võib olla sõltuv hormoonpreparaadi kontsentratsioonist (Hauner et al., 1989), mil ülemäärased doosid võivad diferentseerumist stimuleeriva mõju asemel asuda pärssivasse rolli. Kirjanduse andmed GC rolli kohta lipogeneesis on mõneti vastukäivad – teada, et nii insuliinil kui GC on lipogeneesi stimuleeriv roll, kuid samas näitavad kirjanduse andmed, et kõrged GC hormoonide doosid mõjuvad insuliini kontsentratsioonile veres pärssivalt. Ühelt poolt näitavad kirjanduse andmed koekultuuri tasandil läbiviidud eksperimentide tulemuste alusel, et GC koos kaasuva insuliini mõjuga tõstab lipiidide sünteesiaktiivsust adipotsüütides (Minshull & Strong, 1985), kuid samas on varasemates uuringutes esitatud seisukohad, et GC regulatiivne roll võib avalduda lipiidide sünteesiahela ensüümide aktiivsuse inhibeerimises adipotsüütides (Volpe & Marasa, 1975). GC mitmekülgset mõju rasvkoe massile ja ainevahetusele kirjeldavad ilmekalt andmed GC prolipolüütilise (Campbell et al., 2009) ja antilipolüütilise mõju kohta (Campbell et al., 2011). Esitatud andmed näitavad ka, et *in vitro* tingimustes ulatub GC antilipolüütiline mõju adipotsüütidele ajalisel dünaamikas kaugemale GC otsese mõjustamise perioodist (Campbell et al., 2011). Nimetatud tulemused kinnitavad seisukohta, et GC võib olla nii lipogeneesi kui lipolüüsi stimuleeriv mõju ning efekti realiseerumine kostruktuuride tasemel sõltub nii GC kontsentratsioonist kui mõjustuse ajalisest kestvusest.

1.4 Glükokortikoidide mõju luukoele

On teada, et GC ülemäärane tase alandab luukoe formeerumist ja tõstab samal ajal luukoe resorptsiooniprotsessi aktiivsust. Teisalt on GC mõju avaldumine luukoele, nagu mitmete teiste koeliikidele kompleksse iseloomuga, mis komplitseerib nii destruktiivsete kui regeneratiivsete mehhanismide selgitamist. Samuti on mõneti vastukäivad varasemate

uuringute tulemused *in vivo* ja *in vitro* eksperimentide omavahelisel võrdlusel. Nii on *in vitro* tingimustes näidatud, et GC langetavad luukoe resorbtsiooni läbi osteoklastide apoptootilise aktiivsuse tõusu (Dempster et al., 1997), samas aga näitavad inimuuringute histoloogilised tulemused, et GC mõjul luukoe resorbtsiooni tase tõuseb (Diamond et al., 1997). Võimalikuks selgituseks andmete vasturääkivuse kohta on GC manustamise dünaamika ja ajaline kestvus (Eastell et al., 1998), mil lühiajalisel GC manustamisel ilmneb osteoklastide aktiivsust inhibeeriv efekt ning pikema-ajalisel manustamisel vastupidiselt osteoklastide funktsiooni stimuleeriv mõju. GC pärssiv mõju luukoe remodelleerumisele väljendub läbi koekomponentide ringluse, mis on otseses seoses osteoblastide aktiivsusega. GC mõjutavad osteoblastide funktsionaalsust läbi osteoblastide arenguliste protsesside inhibeerimise ja apoptootilise aktiivsuse võimendamise (Weinstein et al., 1998). On andmeid, et GC mõjutavad luukoe maatriksi komponentide (I tüüpi kollageen) produktsiooni (Delany et al., 1995) ning samuti täiskasvanud osteotsüütide apoptootilist aktiivsust (Plotkin et al., 1999). Morris ja kaasautorid on oma töödes näidanud, et GC hormoonide mõjul langeb Ca^{2+} absorptsioon soolestikus (Morris et al., 1990) ja seetõttu suureneb Ca^{2+} eksretsioon (Ferrari, 2003). On ilmne, et Ca ainevahetuse balansi muutus kajastub luukoe formeerumise ja reformeerumise protsessis. Negatiivne Ca-balanss teeb võimalikuks sekundaarse hüperparatüreoidismi arengu ja edasi sekundaarse protsessina läbi osteoklastide aktiivsuse tõusu luumassi vähenemise. Kirjanduses on hulgaliselt andmeid GC lühi- ja pikaajalise mõju kohta erinevate kudede struktuuridele, arengulistele mehhanismidele ja funktsionaalsuse eripäradele, kuid äärmiselt napilt on seni avaldatud kirjanduses andmeid nii struktuursete kui funktsionaalsete karakteristikute taastumise kohta GC otsese mõju lõppemisel.

2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada glükokortikoidsete hormoonide degeneratiivset mõju katseloomade lihas-, rasv- ja luukoele ning regeneratiivsete protsesside dünaamikat lihas-, rasv- ja luukoe tasandil.

Püstitatud eesmärgi täitmiseks seadsime järgmised ülesanded:

1. Selgitada kõrges doosis glükokortikoidse hormoonpreparaadi manustamise mõju lihas-, rasv- ja luukoe kaalulistele ja integraalsetele näitajatele.
2. Selgitada regeneratiivsete protsesside dünaamika kulgemist lihas-, rasv- ja luukoe tasandil kõrges doosis glükokortikoidse hormoonpreparaadi kroonilise manustamise järgselt.

3. METOODIKA

3.1 Katseloomad

Eksperimendis kasutati täiskasvanud emaseid *Wistari* liini rotte (Scanbur BK AS Sollentuna, Sweden). Katses osales kokku 24 katselooma, kes jagati juhuslikkuse alusel 4 gruppi (n=6): (1) eksperimentaalgrupp, 10p GC; (2) eksperimentaalgrupp, 10p GC + 10 päeva taastumist; (3) eksperimentaalgrupp, 10p GC + 20 päeva taastumist; (4) kontrollgrupp. Katseloomad paigutati puuridesse 4 kaupa. Katseloomad viibisid kogu eksperimendi vältel identsetes keskkonnatingimustes – temperatuur oli 22 ± 2 °C, valguse-pimeduse tsükkel oli 12h/12h, toitu ja vett said katseloomad *ad libitum*. Eksperimendid viidi läbi vastavalt Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi loomkatsete läbiviimise komisjoni loale nr. 48/2006, 17.02.06.

3.2 Glükokortikoidne müopaatia

Deksametasoon (Dexafort 3 mg/ml; International B.V. Boxmeer, the Netherlands) lahjendati 0,15 M NaCl-ga kontsentratsioonini 500 µg/ml. Kõikidele DEX ja DEX-T grupi loomadele süstiti kõhuõõnde 50 µg deksametasooni 100 g kehamassi kohta 10 päeva vältel. K grupi loomadele manustati vastav kogus 0,15 M NaCl. Peale 10 päevast deksametasooniga mõjustamist GC grupi loomad ohverdati, taastumise dünaamika eksperimentaalgruppide katseloomad jäid 20 päevaks standardsetesse tingimustesse taastuma.

3.3 Kehakaalu ja lihaskaalu määramine

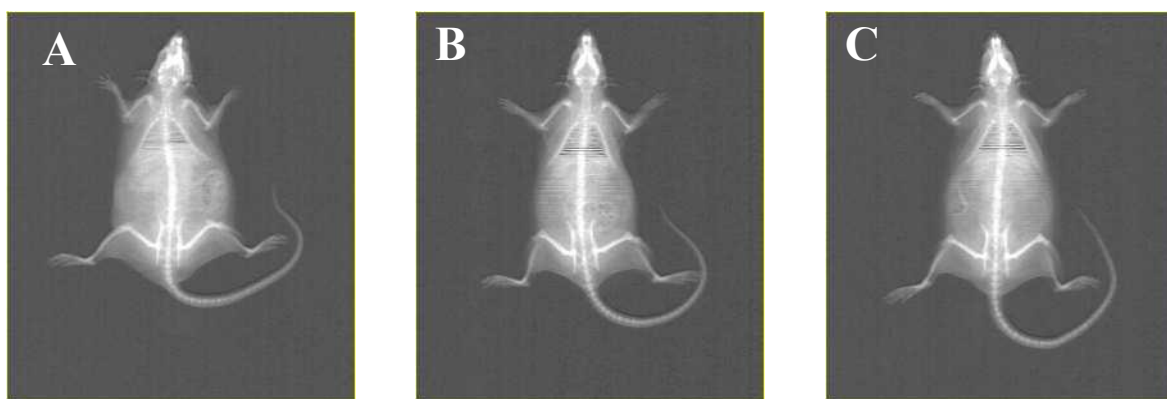
Katseloomi kaaluti eksperimendi algul, 10 päeva peale kõrgete dooside GC hormoonpreparaatide manustamist ning seejärel pärast viimast hormooni manustamist 10 ja 20 päeva pikkuste taastumisperiodide järgselt. Katseloomade kehakaal määrati täpsusega ± 1 g.

Lihaskaalu määramiseks ohverdati katseloomad narkoosipeparaatide üledoseerimise teel (ketamiin (90 mg/1 kg kehakaalu kohta) (Bioketan Vetoquinol Biowet Sp. z o.o.) ja ksülasiin (15 mg/1 kg kehakaalu kohta) (Xylapan Vetoquinol Biowet Sp. z o.o.)) pärast eksperimendiseeriade lõppu. Eraldati *m. soleus* (SOL), *m. plantaris* (PLA), *m. extensor*

digitorum longus (EXT), *m. tibialis anterior* (TA), *m. gastrocnemius* (Gastro), lihased puhastati sidekoest ja rasvkoest. Prepareeritud lihased kaaluti torsioonkaaluga täpsusega ± 1 mg.

3.4 Keha koostise ja luutiheduse määramine

Katseloomade keha rasvaprotsent, rasvamass, rasvavaba mass, luukoe mineraalainete sisaldus ja luukoe tiheduse näitajad määrati DXA (kahekordse kiirega röntgenabsorptsioomeetria) meetodil (Hologic Discovery ODR Series, USA), kasutades spetsiaalset katsekoomade skanneerimise moodulit. Keha koostise määramisel kasutati katseloomadel anesteesiat vastavalt (ketamiin (60 mg/1 kg kehakaalu kohta) (Bioketan Vetoquinol Biowet Sp. z o.o.) ja ksülasiin (9 mg/1 kg kehakaalu kohta) (Xylapan Vetoquinol Biowet Sp. z o.o.) intraperitoneaalselt, tagades anesteesia kestvuse ligikaudu 30 minutiks.



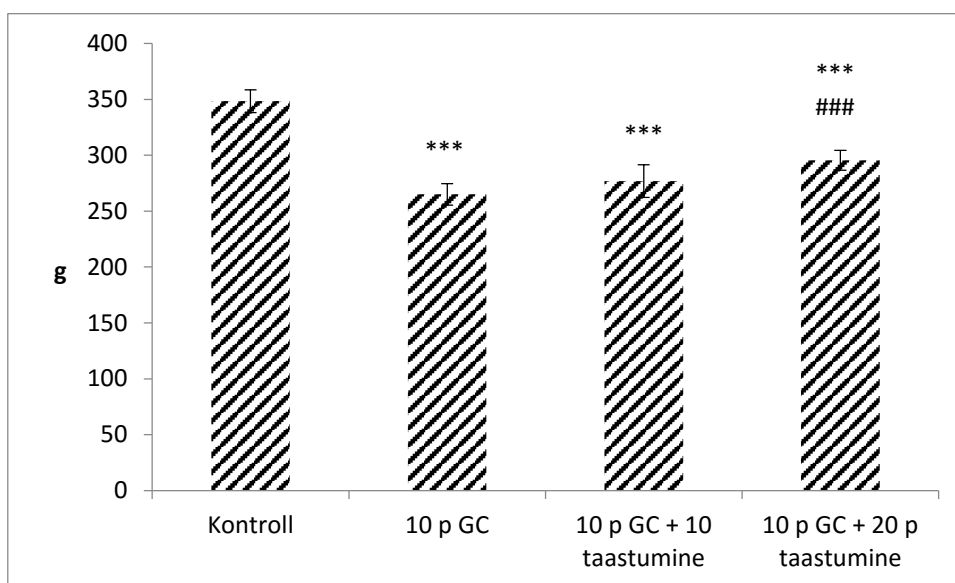
Joonis 1. Katseloomade kogukeha skanneeringud. A – kontroll, B – 10 päeva deksametsooni manustamist, C – 20 päeva taastumist deksametasooni manustamisest.

3.5 Statistiline töötlus

Eksperimentide käigus kogutud andmed töödeldi statistiliselt, tulemused on esitatud $\bar{x} \pm SE$. Eksperimentaalsete ja kontrollgrupi omavaheliste erinevuste selgitamiseks kasutati Studenti-T testi (statistiliselt olulisuse nivoo $p < 0,05$).

4. TÖÖ TULEMUSED

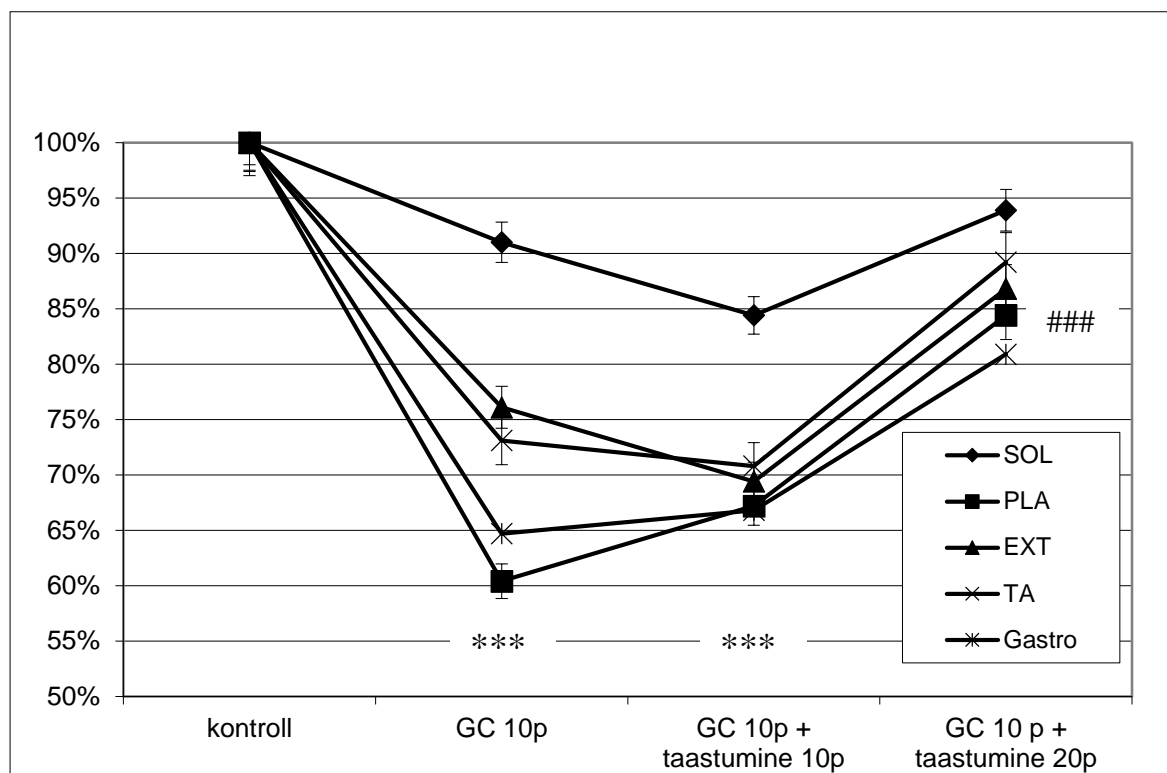
Meie katsete tulemused näitasid, et 10-päevase kõrgete GC hormoonide dooside (50µm/100g/kk) manustamise tulemusena langes uuritavate katseloomade kehakaal 23,1% (Joonis 2). Meie andmete alusel peatus katseloomade kehakaal GC hormoonide manustamisel (10 päeva peale hormoonpreparaadi mõju) ning kaaluive pöördus tõusule 20 päeva möödumisel hormoonpreparaadi manustamise lõpetamisest. Samal ajal näitasid meie tulemused, et kõrgete GC hormoonide toime ulatub kaugemale manustamisperioodist ja pidurdab taastumise aluseks olevate regeneratiivsete protsesside väljendumist (Joonis 2).



Joonis 2. Katseloomade kehakaalu dünaamika indutseeritud GC müopaatia ja 10-ja 20- päevase taastumise tingimustes. n=; $\bar{x} \pm m$; ***- $p < 0,01$ võrreldes kontrollgrupiga; ####- $p < 0,001$ võrreldes GC manustamise kümnenda päevaga.

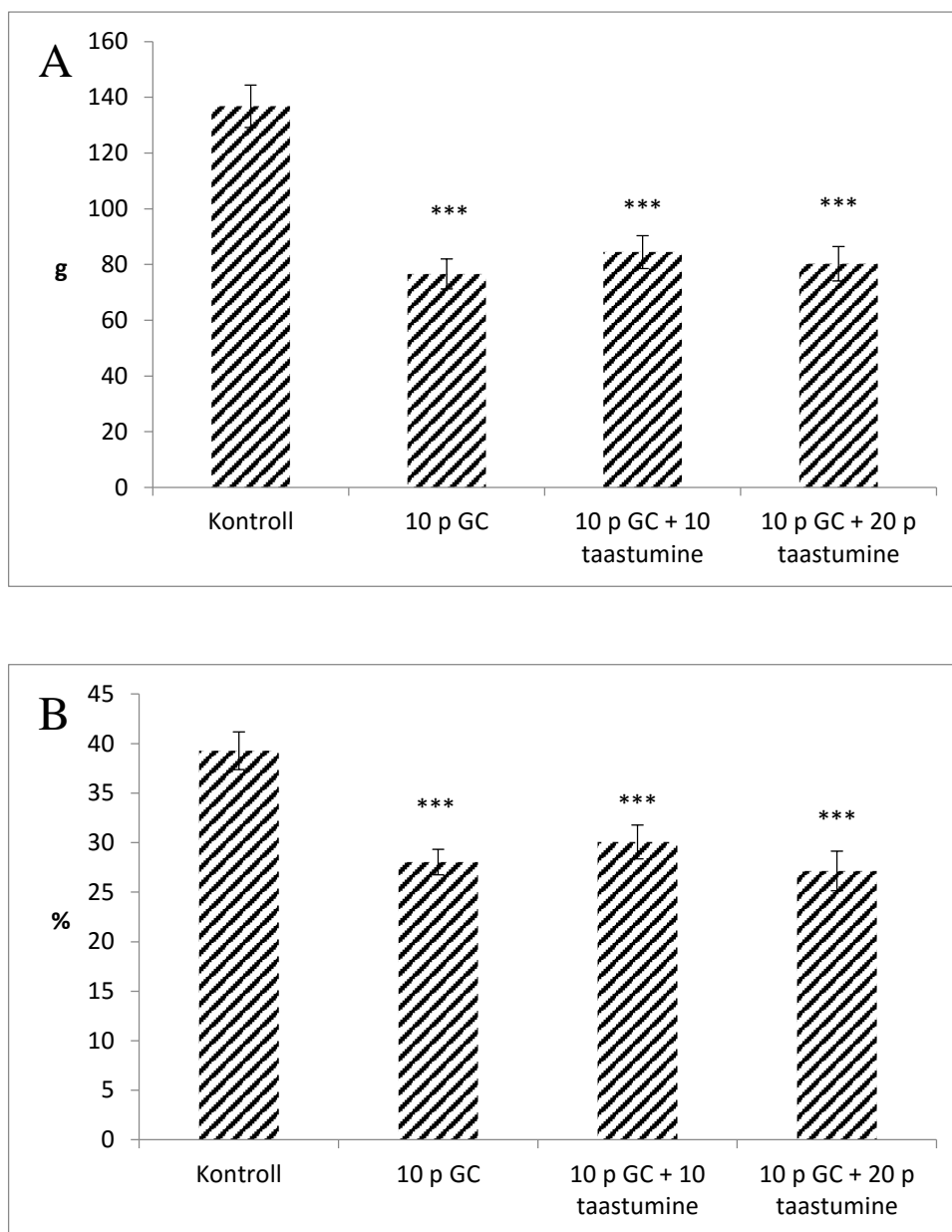
Meie eksperimentide tulemused katseloomade uuritud lihaste kaalu muutuste kohta näitasid, et hormoonpreparaadi manustamise tulemusena langes lihaste kaal 10-päevase perioodi lõpuks ulatuslikult kõrge kiirete lihaskiudude osakaaluga lihastes (*m. plantaris*, *m. extensor digitorum longus*, *m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius*) (Joonis 3). Mõõdukalt oli GC hormoonide poolt tingitud müopaatiline seisund mõjutunud kõrge aeglase lihaskiudude osakaaluga lihase (*m. soleus*) puhul (Joonis 3). Hormoonpreparaadi manustamisele järgnenud taastumisperioodil peatus uuritava 10-päevase perioodi jooksul müopaatilise protsessi areng uuritavates valdavalt kiirete lihaskiudude kõrge osakaaluga lihastes (joonis 3). Meie andmete puhul on huvitav märkida, et aeglase iseloomuga skeetilihase (*m. soleus*) puhul jätkus suund

müopaatia arengule ka hormoonpreparaadi manustamise lõpetamisel (Joonis 3). Samal ajal näitasid meie katsete tulemused, et taastumisperioodi edasisel kestmisel pöörduvad uuritud skeetilihaste kaalunäitajad tõusule, kuid moodustavad 20-päevase taastumisperioodi lõpuks 82-88% kontrolltasemest (Joonis 3).



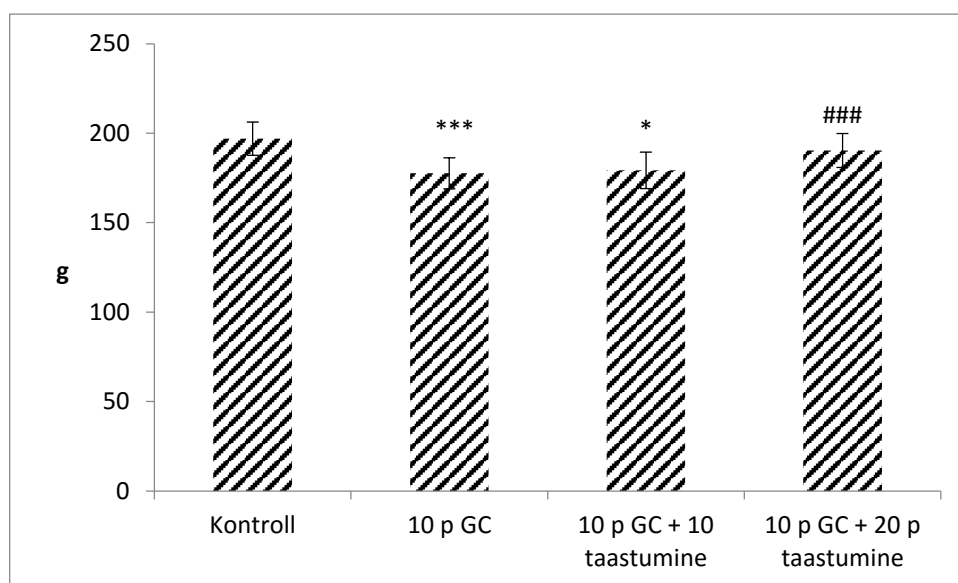
Joonis 3. Katseloomade lihaste SOL (*m. soleus*), PLA (*m. plantaris*), EXT (*m. extensor digitorum longus*), TA (*m. tibialis anterior*), Gastro (*m. gastrocnemius*) kaalu dünaamika indutseeritud GC müopaatia ja taastumise tingimustes. ***- $p < 0,01$ võrreldes kontrollgrupiga; ###- $p < 0,001$ võrreldes GC manustamise kümnenä päevaga.

GC hormoonide kõrgete dooside regulaarne manustamine mõjutab meepoolsete andmete alusel märkimisväärselt rasvkoe osakaalu katseloomade organismis ja rasvkoe protsenti. Nii näitasid meie katsete tulemused, et 10-päevase hormoonpreparaadi manustamise tulemusena langes katseloomade organismi rasva sisaldus kaaluühiku alusel 44% võrra (Joonis 4A) ja protsentuaalse näitaja alusel 28,6% võrra (Joonis 4B). Lisaks näitasid meie eksperimentide andmed, et GC hormoonpreparaadi manustamise lõpetamise järgselt taastumisperioodil (uuritud dünaamika 10 ja 20 päeva) rasvkoe degeneratiivne protsess peatub, kuid sama ei näita meie tulemused katseloomade rasvkoe osakaalu progressiooni kontrolltasemega võrreldes (Joonis 4A ja 4B).



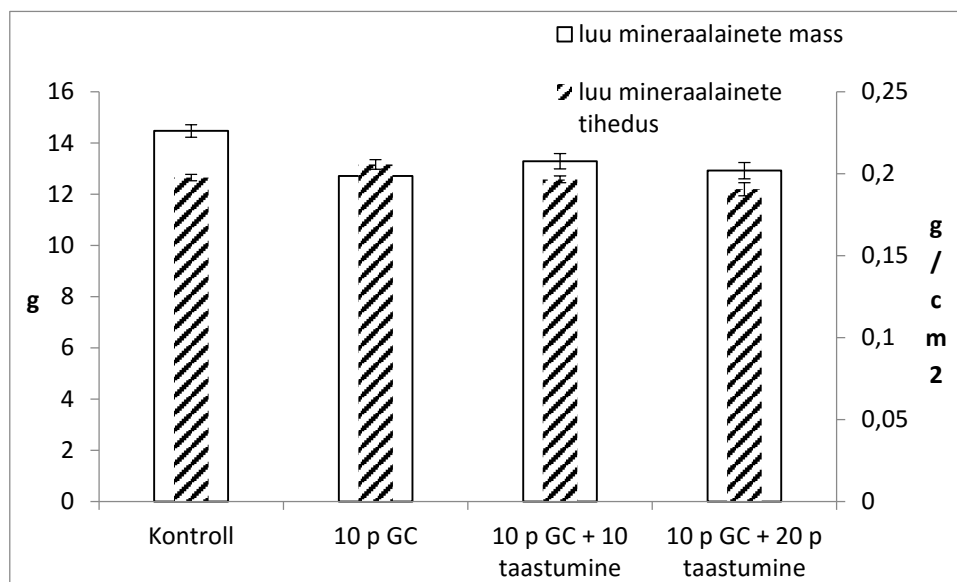
Joonis 4. Katseloomade rasvamassi (A) ja rasvaprotsendi (B) muutused indutseeritud GC müopaatia ja taastumise tingimustes. ***- $p < 0,01$ võrreldes kontrollgrupiga.

Võrreldes omavahel GC hormoonide poolt esile kutsutud muutusi katseloomade rasvamassi ja rasvavaba massi puhul, siis näitasid meie tulemused, et rasvavaba massi langus on kooskõlas nii kehakaalu, üksikute uuritud lihaste kaalu kui rasvamassi muutustega müopaatilise seisundi kujunemise protsessis (Joonis 5). Küll aga ilmneb meie katsete andmetel, et müopaatiaist indutseeriva hormoonpreparaadi manustamisjärgsel taastumisperioodil (20 päeva) tõuseb katseloomade rasvavaba mass võrreldes GC hormooni mõjustamise tasemega (Joonis 5).



Joonis 5. Katseloomade rasvavaba massi muutused indutseeritud GC müopaatia ja taastumise tingimustes. ***- $p < 0,01$ võrreldes kontrollgrupiga; *- $p < 0,05$ võrreldes kontrollgrupiga; ###- $p < 0,001$ võrreldes GC manustamise kümnenda päevaga.

Uurides GC hormoonide mõju luukoe mineraalainete sisalduse näitajatele ja kvaliteedile (luutiheduse näitaja) näitavad meie katsete tulemused, et kasutatud hormoonpreparaadi degeneratiivne mõju luukoe tasandil ei ilmnenu (Joonis 6).



Joonis 6. Luukoe mineraalainete mass ja mineraalainete tihedus indutseeritud GC müopaatia ja taastumise tingimustes. n=6

5. TULEMUSTE ARUTELU

GC hormoonide preparaatidel on lisaks skeletilihaskoe spetsiifilisele destruktiivsele efektile olulised kõrvalmõjud nii rasv- kui luukoele. Terapeutiliste dooside manustamisel avaldub GC hormoonide efekt eelkõige läbi põletikuvastase ja immuno-supressiivse toime. Tänapäeva kliinilises praktikas on kasutusel nii madalad kui äärmiselt kõrged doosid ning viimaste kasutamisel avaldub terve rida soovimatuid kõrvalmõjusid – lihasmassi kadu, rasva ainevahetuse häirumine ja võimalik destruktiivne mõju luukoe ainevahetusele (Seene, 1994; Patschan et al., 2001). Seetõttu on oluline uurida ja selgitada kõrgete GC hormoonpreparaatide destruktiivse mõju väljendumise dünaamikat mitte ainult skeletilihaskoe seisukohast lähtudes, vaid vaadelda kudede tasanditel asetleidvaid vastusreaktsioone laiemalt. Meie katsete tulemused näitasid, et 10 päevaline GC hormooni deksametasooni kõrge doosi (50 µg/100g/kk) regulaarne manustamine kutsub katseloomade kehakaalunäitajates esile ulatusliku languse.

Üheks meie poolt seatud uurimisülesandeks oli degeneratiivsete protsesside foonil uurida erinevate koeliikide tasemel aset leidvate regeneratiivsete protsesside avaldumise dünaamikat. Meie katsete tulemused katseloomade kehakaalu näitajate kohta lubavad väita, et kasutatud hormoonpreparaadi mõju ei piirdu manustamisperioodiga vaid kestab meiepoolsete andmete alusel võrdelise ajaperioodi (10 päeva meie eksperimentides) võrreldes hormoonpreparaadi manustamisperioodiga. Usaldusväärne nihe katseloomade kehakaalu taastumise suunas ilmnes meie andmetel 20-ndal post-eksperimentaalsel päeval, kuid samal ajal jäid kehakaalunäitajad oluliselt madalamaks kontrolltasemega võrreldes. GC hormoonide mõju spetsiifika lihaskoele avaldub läbi lihaskiudude tüübispetsiifilise toime (Seene & Viru, 1982). Meie katsete tulemused näitasid, et uuritud kiire kokkutõmbe iseloomuga lihaskiudude ülekaaluga skeetilihastes on lihaste kaalulangus tunduvalt ulatuslikum võrreldes domineeriva aeglase lihaskiudude tüübiga skeetilihasega. Aeglase lihaskiudude vähene tundlikkus GC toimele võib kirjanduse andmetel olla seotud nende lihaskiudude funktsionaalsuse ja samuti motoorsete ühikute rekruteerumise eripäradega (Seene et al., 1988).

Sarnaselt katseloomade kehakaalu tasandil toimunud muutustega ei taastunud meie katsetulemuste põhjal uuritud kiire kontraktiilseiselooga skeetilihaste kaalunäitajad 10-päevalise post-eksperimentaalse perioodi jooksul ning taastusid osaliselt 20-päevalise post-eksperimentaalse perioodi lõpuks jõudes kontrolltasemega võrreldes oluliselt madalamale tasemele. Kontraktiilse aparaadi struktuuride regeneratiivsete aspektide kõrval võib olulist rolli mängida lihaskiudude elastsete filamentide tasemel aste leidnud patoloogilised protsessid, mis võivad inhibeerida skeetilihaskoe regeneratiivse potentsiaali avaldumist (Aru et al., 2013).

Rasvkude mängib olulist rolli kogu organismi ainevahetuses ja energieetiliste protsesside kindlustamises. Stressihormoonidel on nii rasvkoe energieetilise mehhanismi avaldumises kui rasvamassi regulatsioonis kindel roll. Ühelt poolt soodustavad nii stress, kui GC hormoonid rasvamassi kasvu, kuid samal ajal on andmeid, et GC hormoonidel võib olla oluline lipolüütiline roll (Xu et al., 2009). Meie katsete tulemused näitasid, et kõrgete GC hormoonpreparaadi dooside manustamise tulemusena langes katseloomade organismis rasvamass kui ka rasvaprotsent keha kompositsioonilise näitajana. Huvitav on meie katse tulemuste põhjal märkida, et regulaarselt manustatud (10 päeva) deksametasooni lipolüütiline mõju väljendus oluliselt kogu post-eksperimentaalse taastumisperioodi jooksul. Erinevalt skeletilihaskoe ja üksikute uuritud lihaste kaalunäitajatest, ei ole 10-päevalisele GC hormoonpreparaadi manustamisele järgnev 20-päevaline taastumisperiood piisav rasvamassi taastumisprotsesside initsieerimiseks. Eeltoodut kinnitavad meie katsete tulemused rasvavaba massi dünaamika kohta GC manustamisel ja sellele järgneval taastumisperioodil. Düspropostsionaalsust erinevate kudede omavahelisel võrdlusel saab selgitada skeletilihaskoe adekvaatselt säilinud regeneratsioonivõimega, mille puhul destruktsioon ise on heaks regeneratiivsete mehhanismide stimulaatoriks. Kuigi on kirjanduses andmeid, et GC hormoonide mõjul skeletilihaste müogeensete satelliitrakkude arvukus langeb (Schultz & Darr, 1990). Võib spekuloida, et müogeense regeneratiivse potentsiaali langus mõjutab koe taastumisvõimet pikaajalisel GC hormooniga mõjustamisel. Kui normaalfüsioloogilistes tingimustes on GC adipogeneesi stimuleeriv roll, siis on kirjanduses andmeid, et kõrgete eksogeensete GC hormoonide manustamine tingib adipotsüütides morfoloogilisi muutusi hüpertrofeerumise suunas, mis võib viia rakkude sisekeskkonna häirimisele ja mõjutada rasvkoemassi tervikuna (Rebuffe-Scrive et al., 1992). Autorid on ka näidanud lipogeneesi reguleerivate ensüümide aktiivsust GC hormoonide toimel, mis võib omakorda olla oluliseks rasvamassi mõjutavaks faktoriks (Volpe & Marasa, 1975).

GC hormoonide kõrge tase võib tingida patoloogilisi muutusi luukoestruktuuris ja seeläbi ka funktsionaalsuses (Manelli & Giustina, 2000). Autorid on näidanud, et GC kõrge taseme mõjul on luukoe formeerumine ja reformeerumine inhibeeritud läbi osteoblastide GC retseptorite (Silvestrini et al., 1999). Samas on teada, et luukoe formeerumine on kompleksne protsess ning GC võimalik mõju osteoblastidele väljendub läbi jagunemismehhanismi inhibeerimise, läbi osteoblastide formeerumise pidurdamise ja läbi apoptootilise aktiivsuse võimendamise osteoblastide puhul (Weinstein et al., 1998). Eelteadu põhjal saab öelda, et GC mängivad olulist rolli luukoe formeerumisprotsessis.

Meie katsete tulemused näitasid, et kõrgete GC dooside manustamine 10 päeva jooksul olulisi degeneratiivseid muutusi katseloomade luukoes esile ei kutsunud. Oma andmetele tuginedes võime spekuloida, et 10-päevalist deksametasooni manustamist tuleb luukoe mõjutamise kontekstis lugeda võrdlemisi lühiajaliseks, mil luu reformeerumise erinevad dünaamilised aspektid ei ole püsivalt väljendunud. Kirjanduses on ka andmeid, mis näitavad osteoblastide apoptootilise aktiivsuse tõusu kõrge GC taseme foonil (Dempster et al., 1997). Luukoe resorptsiooni pidurdumine GC mõjul võib meie arvates olla oluliseks luukoe mineraalainete massi ja luutihedust säilitavaks faktoriks lühiajalisel GC hormoonidega mõjustamisel. Võib spekuloida, et osteoblastide aktiivsuse langus ja teisalt osteoblastide mehhanismi inhibeerimine on koosmõjus faktorid, mis viivad pikemaajalisel kestmisel luukoe kvaliteedi ja funktsionaalsuse halvenemisele.

Meie töö tulemusi mõjutavaks faktoriks on GC agressiivne toime erinevatele koeliikidele ja organitele, mille tulemusena areneb juba GC lühiajalisel manustamisel välja ulatuslik destruktivne protsess. Nii degeneratsiooni kui sellele järgneva regeneratsiooni dünaamiliste aspektide uurimine erinevate kehakompositsiooni parameetrite suunal oli meie uuringutes raskendatud läbi paralleelse GC manustamise ja katseloomade anesteesia esilekutsumise vajaduse. Täiendavate andmete registreerimine ajalisel dünaamikas annaks olulist informatsiooni degeneratiivsete protsesside kirjeldamisel ja taastumisprotsesside suunamisel.

6. JÄRELDUSED

Käesoleva töö raames katseloomadel läbiviidud eksperimentide tulemuste põhjal saame teha järgnevad järeldused:

1. Kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi kroonilise manustamise tulemusena langeb katseloomade kehakaal, kõrge kiirete lihaskiudude osakaaluga skeletilihaste kaal, rasva mass ja rasvavaba mass.
2. Kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi krooniline manustamine ei avalda mõju katseloomade luumassi ja luutiheduse näitajatele.
3. Kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi degeneratiivne mõju väljendub preparaadi manustamise lõpetamisel katseloomade lihas- ja rasvkoe tasandil vähemalt 20 päeva.
4. Kõrgete dooside glükokortikoidse hormoonpreparaadi kroonilise manustamise järgselt avaldub regeneratiivne potentsiaal lihaskoe tasandil 20-päevasel taastumisperioodil, kuid mitte rasvkoe tasandil.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Aru M, Alev K, Gapeyeva H, Vain A, Puhke R, et al. Glucocorticoid-induced alterations in titin, nebulin, myosin heavy chain isoform content and viscoelastic properties of rat skeletal muscle. *Adv Biol Chem* 2013; 3: 70-75.
2. Askari A, Vignos PJ Jr, Moskowitz R. Steroid myopathy in connective tissue disease. *Am J Med* 1976; 61: 485-492.
3. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1999; 140: 3188-3196.
4. Campbell JE, Fediuc S, Hawke TJ, Riddell MC. Endurance exercise training increases adipose tissue glucocorticoid exposure: adaptations that facilitate lipolysis. *Metabolism* 2009; 58: 651-60.
5. Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C198-209.
6. Delany AM, Gabbittas BY, Canalis E. Cortisol down regulates osteoblast α 1(I) procollagen mRNA by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Cell Biochem* 1995; 57: 488-494.
7. Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, Horbert WR, Antakly T. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* 1997; 154: 397-406.
8. Diamond T, Levy S, Day P, Barbagallo S, Manoharan A, et al. Biochemical, histomorphometric and densitometric changes in patients with multiple myeloma: effects of glucocorticoid therapy and disease activity. *Br J Haematol* 1997; 641-648.
9. Eastell R, Reid DM, Compston J, Cooper C, Fogelman I, et al. A UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *J Intern Med* 1998; 244: 271-292.
10. Ferrari P. Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 575-589.

11. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; 84: 1663-1670.
12. Holloszy J, Chen M, Cartee G, Young J. Skeletal muscle atrophy in old rats: Defferential changes in three fiber types. *Mech Ageing Dev* 1991; 60: 199-213.
13. Kaasik P, Umnova M, Pehme A, Aru M, Selart A, et al. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarties of regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 105 (1-5): 85-90.
14. Manelli F, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(3): 79-85.
15. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294: 2166-2170.
16. Minshull M, Strong CR. The stimulation of lipogenesis in white adipose tissue from fed rats by corticosterone. *Int J Biochem* 1985; 17: 529-532.
17. Morris HA, Need AG, O'Loughlin PD, Horowitz M, Bridges A, et al. Malabsorption of calcium in corticosteroid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 305-308.
18. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2001; 29(6): 498-505.
19. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-1374.
20. Rebuffe-Scrive M, Krotkiewski M, Elfverson J, Bjorntorp P. Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1122-1128.
21. Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B, Rodin J. Effect of chronic stress and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiol Behav* 1992; 52: 583-590.
22. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23: 160-170.

23. Seene T. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 50: 1-4.
24. Seene T, Alev K. Effect of glucocorticoids on the turnover rate of actin and myosin heavy chains on different types of skeletal muscle fibres. *J Steroid Biochem* 1985; 22: 767-771.
25. Seene T, Kaasik P. Role of Myofibrillar Protein Catabolism in Development of Glucocorticoid Myopathy: Aging and Functional Activity Aspects. *Metabolites* 2016; 6(15): 1-9.
26. Seene T, Kaasik P, Pehme A, Alev K, Riso EM. The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 201-206.
27. Seene T, Umnova M, Alev K, Pehme A. Effect of glucocorticoids on contractile apparatus of rat skeletal muscle. *J Steroid Biochem* 1988; 29: 313-317.
28. Seene T, Umnova M, Kaasik P. The exercise myopathy. In: *Overload, Performance Incompetence, and Regeneration in Sport*; Lehmann M, Foster C, Gastmann U, Keizer H, Steinacker J, eds; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY; 1999, 119-130.
29. Seene T, Viru A. The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibres and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. *J Steroid Biochem* 1982; 16: 349-352.
30. Shultz E, Darr K. The role of satellite cells in adaptive or induced fiber transformations. In: *The Dynamics State of Muscle Fibers*; Pette D, eds; Walter de Gruyter: Berlin, Germany; 1990, 667-681.
31. Silvestrini G, Mccetti P, Ballanti P, Di Grezia R, Bonucci E. Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat. *Endocr Res* 1999; 25: 117-128.
32. Singleton J, Baker B, Thorburn. A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* 2000 ;14: 2945-2950.
33. Smals A, Kloppenborg P, Benroad T. Plasma testosterone profiles in cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1977; 45: 240-245.
34. Tomas, F. Effect of corticosterone on myofibrillar protein turnover in diabetic rat as assessed by N-methylhistidine excretion. *Biochem J* 1982; 208: 593-601.

35. Volpe JJ, Marasa JC. Hormonal regulation of fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthesis in mammalian adipose tissue and liver. *Biochim Biophys Acta* 1975; 380: 454-472.
36. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; 102: 274-282.
37. Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 1161-70.

AUTORI LIHTLITSENTS

Mina Anu Ellam

(sünnikuupäev: 09.04.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Glükokortikoidsete hormoonide kõrgete dooside mõju lihas-, rasv- ja luukoele ning regeneratsioonipotentsiaali avaldumisele,

mille juhendajad on Priit Kaasik ja Karin Alev,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus,

15.05.2016